

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.14.018

## 微孔板变色硅胶显色法检测结核分枝杆菌利福平耐药性\*

陈俊林<sup>1</sup>, 黄飞<sup>1</sup>, 顾德林<sup>1△</sup>, 瞿梅<sup>1</sup>, 胡忠义<sup>2</sup>, 丁元生<sup>3</sup>

(1. 江苏省南通市第六人民医院结核科 226011; 2. 同济大学附属上海市肺科医院 200433;  
3. 上海积彩医疗器械有限公司 201508)

**[摘要]** **目的** 探讨微孔板变色硅胶显色法快速检测利福平(RIF)耐药结核分枝杆菌(MTB)的临床应用价值。**方法** 对江苏省南通市第六人民医院结核病实验室保存的 50 株 MTB 临床分离株用微孔板变色硅胶显色法检测 RIF 耐药性,并与 Bactec MGIT960 作比较。再对 40 份临床涂阳痰标本使用微孔板变色硅胶显色法与 Bactec MGIT960 同时进行 RIF 药敏检测,并比较检测结果的灵敏度、特异度、准确度。**结果** 微孔板变色硅胶显色法最佳接种菌量为  $10^{-3}$  mg/mL、检测最佳时间为 7~10 d、RIF 的最低抑菌浓度(MIC)判断界值为 1.00  $\mu$ g/mL。以 Bactec MGIT960 检测法为金标准,微孔板变色硅胶显色法对涂阳痰标本 RIF 药敏检测灵敏度达 94.12%,特异度为 100%,准确度为 97.37%。**结论** 微孔板变色硅胶显色法可直接检测痰标本中 MTB 对 RIF 的药物敏感性。

**[关键词]** 结核分枝杆菌;利福平;微生物敏感性试验;微孔板变色硅胶显色法

**[中图法分类号]** R331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)14-1912-05

### Microplate silica allochroic gel assay for detecting rifampicin resistance of *Mycobacterium tuberculosis*\*

CHEN Junlin<sup>1</sup>, HUANG Fei<sup>1</sup>, GU Delin<sup>1△</sup>, QU Mei<sup>1</sup>, HU Zhongyi<sup>2</sup>, DING Yuansheng<sup>3</sup>

(1. Department of Tuberculosis, Nantong Municipal Sixth People's Hospital, Nantong, Jiangsu 226011 China; 2. Affiliated Shanghai Pulmonary Hospital, Tongji University, Shanghai 200433, China; 3. Shanghai Jicai Medical Instrument Co., Ltd., Shanghai 201508, China)

**[Abstract]** **Objective** To discuss the clinical application value of microplate allochroic silica gel assay for rapidly detecting rifampicin(RIF)-resistance of *Mycobacterium tuberculosis*(MTB). **Methods** Fifty MTB clinical isolates preserved in the tuberculosis(TB) laboratory of Nantong Municipal Sixth People's Hospital were detected RIF-resistance by using the microplate allochroic silica gel assay and compared with the Bactec MGIT960 method. Then, the RIF susceptibility test in 40 clinical sputum smear-positive specimens were simultaneously detected by using the microplate allochroic silica gel assay and Bactec MGIT960. Finally the sensitivity, specificity and accuracy of the test results were compared. **Results** The optimal inoculation volume of MTB was  $10^{-3}$  mg/mL, the optimal detection time was 7-10 d and the judging critical value of the RIF minimum inhibitory concentration(MIC) was 1.00  $\mu$ g/mL by microplate allochroic silica gel assay. With the Bactec MGIT960 test as the gold standard, the sensitivity, specificity and accuracies of microplate allochroic silica gel assay for RIF-resistance susceptibility test of smear-positive specimens were 94.12%, 100% and 97.37% respectively. **Conclusion** Microplate Allochroic silica gel assay can be used for directly detecting the MTB sensitivity to RIF of in sputum specimens

**[Key words]** mycobacterium tuberculosis; rifampin; microbial sensitivity tests; microplate allochroic silica gel assay

结核病是中国政府重点控制的三大传染病之一,特别是耐药结核分枝杆菌(MTB)的流行,已成为困扰公共卫生的最大问题<sup>[1-2]</sup>。其中耐利福平(RIF)的 MTB 尤其受到格外重视,这是因为 RIF 是现代结核病化疗的一线最主要药物,也是公认缩短结核病疗程和提高治愈率的最关键药物。如果能及早发现耐

RIF 的 MTB,及时更改抗结核治疗方案,将提高结核病治愈率、避免无效用药和减少耐多药 MTB 形成<sup>[3]</sup>。MTB 药物敏感性检测金标准为罗氏培养及比例法药敏,但因其需耗时间为 4~8 周,不能满足实际需要。而目前一些 MTB 快速药敏检测技术如 Bactec MGIT960、基因检测技术、微量液体最低抑菌浓度

\* 基金项目:国家十二五结核重大专项项目(2013ZX10003001-003)。 作者简介:陈俊林(1970-),主任医师,本科,主要从事结核病的诊治研究。 △ 通信作者, E-mail: cjlnt@126.com。

(MIC)技术等存在设备和试剂昂贵或操作要求高,判读结果易受到主观影响<sup>[4-5]</sup>,不能推广应用于基层实验室。由本课题组研制一款 MTB 药敏检测新型实用产品——24 孔微量液体培养硅胶显色板,即将进行产业化。本实验利用该新型产品除对 MTB 临床分离株进行了 RIF 药物敏感性测试,还尝试对涂阳痰标本的 RIF 药物敏感性进行了检测,进一步缩短了报告时间,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** MTB 标准菌株 H37Rv (ATCC27294)和牛分枝杆菌(*M. bovis* ATCC 19210)购自国家菌种保藏中心,50 株 MTB 临床分离株来自江苏省南通市第六人民医院结核科 2013 年 5 月至 2015 年 1 月住院肺结核患者的痰标本培养物,经菌种鉴定为 MTB。40 例涂阳痰标本来源于该院结核科 2015 年 1 月至 2016 年 1 月住院复治涂阳肺结核患者,痰抗酸杆菌菌量分级:按姜-尼染色镜检结果菌量分级标准以 1<sup>+</sup>、2<sup>+</sup>、3<sup>+</sup>、4<sup>+</sup>记录<sup>[6]</sup>。

**1.1.2 试剂与仪器设备** RIF 购自美国 Fluka 公司;Bactec MGIT 检测仪、61010A-1 型比浊仪,购自美国 BD 公司;GNP-92700 隔水式培养箱,购自上海精宏实验设备有限公司;对硝基苯甲酸(PNB)购自美国 Sigma 公司;24 孔变色硅胶培养板,由上海积彩医疗器械有限公司提供;微孔板检测仪购自东乐自然基因生命科学公司。

**1.1.3 试剂配置** 液体培养基配制参见文献<sup>[7]</sup>的方法,以 7H9 培养基为基础液,辅以牛血清清蛋白,葡萄糖等,孔雀绿抑制非分枝杆菌微生物生长。药物配制:RIF 现用二甲基甲酰胺(DMF)溶解配制成 10 mg/mL,再用液体培养基进行稀释,终浓度为 0.25~16 μg/mL;PNB 用液体培养基稀释至终浓度为 800 μg/mL。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 微孔板变色硅胶显色法检测药敏试验

**1.2.1.1 微孔板变色硅胶显色法检测 MTB 临床分离株对 RIF 的敏感性** 将 MTB 临床分离株于液体培养基培养 2 周后,用液体培养基重悬,磨菌 5~10 min 后静置 15 min,取上层均匀的悬浊液用液体培养基比浊至待用。取适量 1.00 mg/mL 的菌液按终浓度要求进行稀释,使液体培养基中菌体的终浓度分别为 10.00<sup>-1</sup> mg/mL、10.00<sup>-2</sup> mg/mL、10.00<sup>-3</sup> mg/mL 和 10.00<sup>-4</sup> mg/mL。24 孔微孔板中设定阳性对照孔、阴性对照孔、测试孔。阳性对照孔加不含 RIF 培养基、接种不同浓度的菌液 0.40 mL;阴性对照孔加不含 RIF 培养基、不接种菌,作为阴性控制;测试孔中加入 0.40 mL 不同浓度含 RIF 培养基,再分别接种不同浓度的菌液 0.40 mL。用透明胶带将培养板封好装入一次性密封袋,置于 37 °C 温箱培养。从培养

第 2 天起,每天观察微孔板底硅胶颜色是否由天蓝色逐渐变黄色,最多观察 21 d。实验结果通过比较测试孔与阳性对照孔中菌株生长速度进行判断。判断方法是当阳性对照孔生长时,测试孔尚未生长,说明测试孔 MTB 生长被药物抑制,判为敏感;而当测试孔 MTB 先于对照孔或与对照孔同时生长,说明药物不能抑制测试菌株繁殖,判断该测试孔对 RIF 耐受。结果判断时间为 5~15 d,超过 21 d 不生长需重复实验。质量控制:每次实验均以 H37Rv 为敏感株质控,以牛分枝杆菌为耐药株质控,同一菌株的测试结果重复检测 3 次。结果观察:将 24 孔微孔板放置于自制的倒置放大镜上[从倒置放大镜中可以观察微孔板底硅胶的颜色变化(空白板,图 1);B1、C1、D1、B4 微孔板底硅胶的颜色由天蓝色逐渐变黄色,提示 MTB 生长(图 2)]或者通过微孔板检测仪进行检测,观察并记录结果。MIC 定义为微孔板底含指示剂天蓝色硅胶完全没有发生颜色改变的最小药物浓度。

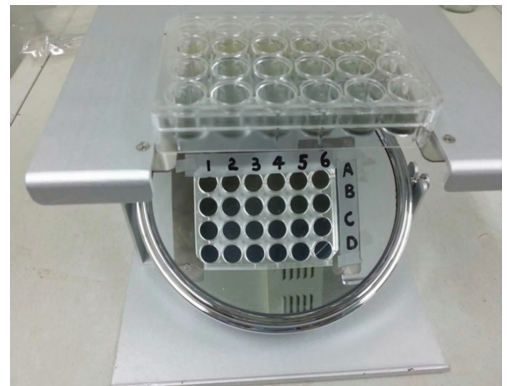


图 1 24 孔微孔板正置于放大镜支架上

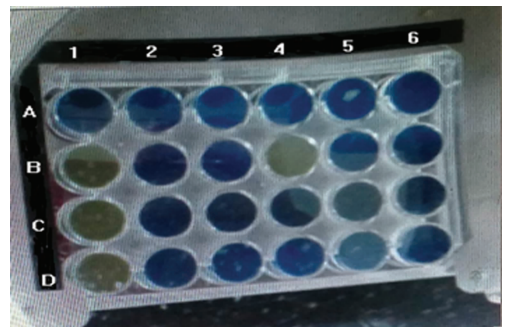


图 2 24 孔板从放大镜中观察到的底部图(测试后)

**1.2.1.2 微孔板变色硅胶显色法检测涂阳痰标本 RIF 敏感性** 加设 PNB 含药孔,将痰标本液化去污染处理后的沉淀,用液体培养基洗涤 2 遍,用 5.00 mL 液体培养基重悬。参照 1.2.1.1 流程向阳性对照孔、测试孔、PNB 含药孔各加入 0.40 mL 标本沉淀悬浊液,再进行培养观察,最多观察 50 d。若对照孔内有细菌生长,PNB 含药孔无细菌生长,则说明该标本中为 MTB;若对照孔内有细菌生长,PNB 含药孔有细菌生长,则说明标本中为非 MTB。

#### 1.2.2 Bactec MGIT960 培养及药敏试验

**1.2.2.1 MTB 临床分离株培养** 经前处理后使用 Bactec MGIT960 操作系统进行 MTB 液体培养,取阳性第 3~5 天培养管,无菌吸取 1.00 mL 阳性肉汤至 4 mL 无菌生理盐水中,作为稀释菌液,再以此稀释菌液 1:100 稀释作为对照菌液,分别以无菌方法加入 500.00  $\mu$ L 对照菌液和稀释菌液于 Bactec MGIT960 对照管和加有 RIF 的药物培养管中颠倒混匀(培养基的药物浓度为 1.00  $\mu$ g/mL)。放入 Bactec MGIT960 培养箱中,仪器会在 15 d 之内会自动报告敏感与耐药结果。质量控制:每次药敏试验均采用 H37Rv 标准株作为阳性参照,以质控药敏检测结果。

**1.2.2.2 涂阳痰标本培养** 取液化去污染后的标本悬液 0.50 mL 接种于 Bactec MGIT960 培养检测管中,参照 1.2.2.1 流程进行培养及 RIF 药敏检测。

**1.3 统计学分析** 使用 SPSS13.0 统计软件分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。根据受试者工作特征(ROC)曲线分析,使用 Medcalc 软件计算 RIF 区分耐药和敏感菌株的最佳阈值。

## 2 结果

### 2.1 临床分离菌株检测结果

**2.1.1 最佳检测菌量的选择** 以 Bactec MGIT960 药敏结果为标准,当加入孔内 MTB 菌株量终浓度为  $10.00^{-1}$  mg/mL、 $10.00^{-2}$  mg/mL 时,50 株已知药敏结果的菌株显示:无论是耐药菌株还是敏感菌株,接种 2 d 后在各药物浓度测试孔内可见微孔板底硅胶的颜色由天蓝色逐渐变黄色,至 7 d 后阳性对照孔可观察到微孔板底硅胶的颜色由天蓝色逐渐变黄色,提示有 MTB 生长;接种  $10.00^{-3}$  mg/mL 浓度 7~10 d 时 95% 耐药菌测试孔和对照孔可观察到微孔板底硅胶的颜色由天蓝色逐渐变黄色,敏感菌株测试孔孔底硅胶颜色无改变;当菌量  $10.00^{-4}$  mg/mL 时,10 d 内对照孔无肉眼可见菌体生长出现,80% 耐药菌测试孔和 30% 对照孔 14 d 后可以观察到微孔板底硅胶的颜色改变。基本确定本研究最佳检测菌量终浓度为  $10.00^{-3}$  mg/mL。

**2.1.2 临床分离菌株的药敏检测结果** 微孔板变色硅胶显色法与 Bactec MGIT960 药敏结果比较,50 株 MTB 临床分离株经过微孔板变色硅胶显色法与 Bactec MGIT960 检测药敏结果(表 1)。两法检测 RIF 药敏结果相符 49 株,不符 1 株。以 Bactec MGIT960 药敏结果为标准,微孔板变色硅胶显色法检测 RIF 灵敏度达 94.12%,特异度为 100%,准确度为 97.43%,同 Bactec MGIT960 高度一致(符合率 98.00%),差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.92, P > 0.05$ )。

**2.1.3 最佳药敏结果报告时间比较** 以 Bactec MGIT960 药敏报告时间为参照,从菌液加入含 RIF 药物培养板开始计时,Bactec MGIT960 药敏报告时间为 4~13 d,平均 7.70 d。微孔板变色硅胶显色法

检测时间 4~15 d,平均 8.20 d。微孔板变色硅胶显色法检测时间稍长于 Bactec MGIT960 药敏报告时间,但二者比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见表 2。

表 1 两种方法检测 RIF 药敏结果(n)

Bactec MGIT960	微孔板变色硅胶药敏		合计
	耐药	敏感	
耐药	23	0	23
敏感	1	26	27
合计	24	26	50

表 2 二者检测 RIF 药敏报告时间比较[n=50,n(%)]

报告时间(d)	微孔板变色硅胶	Bactec MGIT960 药敏
1~<3	0	0
3~<5	2(4.00)	2(4.00)
5~<7	7(14.00)	9(18.00)
7~<9	20(40.00)	23(46.00)
9~<11	13(26.00)	11(22.00)
11~<13	5(10.00)	4(8.00)
13~<15	2(4.00)	1(2.00)
15~<17	1(2.00)	0
17~<20	0	0
$\geq 21$	0	0

**2.1.4 最佳药物敏感性判断界值的选择** 根据 50 株 Bactec MGIT960 药敏检测结果,在最佳检测菌量终浓度为  $10.00^{-3}$  mg/mL 条件下,微孔板变色硅胶显色法检测 MTB 临床分离株的 MIC 分布为 0.25  $\mu$ g/mL 18 株,0.50  $\mu$ g/mL 8 株,1.00  $\mu$ g/mL 1 株,2.00  $\mu$ g/mL 7 株,4.00  $\mu$ g/mL 13 株,8.00  $\mu$ g/mL 3 株,16.00  $\mu$ g/mL 0 株。经 Medcalc 分析 ROC 曲线下面积为(AUC)0.950、灵敏度 95.61%、特异度 99.12%。

### 2.2 涂阳痰标本检测结果

**2.2.1 二者检测涂阳痰标本 RIF 药敏结果** 40 例涂阳痰标本经过 Bactec MGIT960 培养及药敏检测敏感株 21 例,耐药 17 例,培养阴性 1 例,鉴定为非 MTB 1 例;微孔板变色硅胶显色法检测结果为敏感株 22 例,耐药 16 例,培养阴性 1 例,非 MTB 1 例。两种药敏方法结果相符合 38 株,不符合 1 株,符合率为 97.44%(38/39);灵敏度为 94.12%(16/17),特异度为 100%(21/21),准确度为 97.37%(37/38),两种方法检测结果比较差异无统计学意义( $\chi^2 = 0.90, P > 0.05$ )。

**2.2.2 微孔板变色硅胶直接检测涂阳痰标本 RIF 药敏时间** 从处理后的标本加培养板或培养管开始计时,Bactec MGIT960 药敏报告时间为 10~27 d,平均

表 3 微孔板变色硅胶显色法直接检测涂阳痰标本 RIF 药敏时间(d)

分级	n	1~2	3~4	5~6	7~8	9~10	11~12	13~14	15~16	17~20	≥21	中位数(范围,d)
1 <sup>+</sup>	12	0	0	0	0	0	1	1	1	1	7	24.10(11~42)
2 <sup>+</sup>	12	0	0	0	0	1	1	2	1	1	6	18.20(9~33)
3 <sup>+</sup>	10	0	0	0	1	1	2	2	0	1	3	16.20(7~24)
4 <sup>+</sup>	5	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	11.60(7~22)

19 d。微孔板变色硅胶显色法检测时间 8~42 d,平均 20 d,痰涂阳标本检测时随标本中菌量的增多而减少,使用微孔板检测仪观察同一份标本在阳性对照孔、测试孔最佳报告时间和硅胶颜色改变的差异,可初步判断痰标本中 MTB 异质性耐药。而微孔板变色硅胶显色法检测时间稍长于 Bactec MGIT960 药敏报告时间,但差异无统计学意义( $P>0.05$ )。微孔板变色硅胶显色法直接检测涂阳痰标本 RIF 药敏时间,见表 3。

### 3 讨 论

基于耐药结核病特别是耐 RIF 流行现状,开发 MTB 快速药敏检测技术显得迫切而重要。目前 MTB 表型快速药敏检测技术如 Bactec MGIT960、微量液体 MIC、药物敏感度检测技术(MODS)、液体变色培养等开始应用于一些较大医疗机构,但因为存在设备、试剂昂贵或操作要求较高<sup>[8-10]</sup>,很难推广应用。而一些成熟的基因检测技术基于 PCR-DNA 为基础,如高分辨率熔解曲线技术、XpertMTB/RIF 技术、基因芯片技术等虽然快速、高效,但很难覆盖所有的基因突变位点、不能区别活菌及死菌、不能判断异质性耐药、不能检测 MIC 即不能鉴别低浓度耐药还是高浓度耐药<sup>[11-13]</sup>,实际使用受到限制。

本研究团队综合考虑了现有检测技术的优缺点,设计制造出一新型快速 MTB 药敏诊断产品,即含变色硅胶的微孔板。其基本设计原理为 MTB 生长过程中会产生 CO<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub> 能和酸碱指示剂发生反应导致指示剂颜色改变来间接判读 MTB 生长繁殖能力。既往一些检测产品往往直接将指示剂加入培养基中<sup>[14]</sup>,可能导致结核杆菌生长环境改变并影响结果判断,为彻底解决这一难题,本课题组利用硅胶具有固载酸碱指示剂离子和吸收 CO<sub>2</sub> 的性能<sup>[15]</sup>,将精选的酸碱指示剂离子(对二甲酚蓝离子液体)通过特殊工艺固载到透明 B 型硅胶中,再将若干量成品塑形在 24 孔微孔板底部。实际检测过程中,微孔板内如果有 MTB 生长,产生的 CO<sub>2</sub> 就被硅胶吸收并与其中酸碱指示剂发生反应导致硅胶颜色改变,肉眼就能观察结果。且经过特殊处理 B 型硅胶具有低表面张力和低表面能优点<sup>[16]</sup>,有疏水、防粘等各项优异性能,防止了培养基中液体和固载在硅胶中的指示剂逆向流动;B 型硅胶具有的惰性特点保证了 MTB 生长环境稳定。

本实验组首先利用该产品对 MTB 临床分离菌株进行 RIF 药敏测试,这是因为 MTB 临床分离菌株是具有繁殖能力强的优势菌群、容易定量并能保证实验结果判读。通过对 50 株 MTB 临床分离株药敏测试并与 Bactec MGIT960 标准药敏体系作对比<sup>[17-18]</sup>,本研究小组发现:该产品检测最佳观察时间为 7~10 d;最佳接种菌量为 10.00<sup>-3</sup> mg/mL,菌量太高因影响杀菌效果易造成假阳性,菌量太低,会延长观察时间;确定 RIF 最佳 MIC 判断界值为 1.00 μg/mL,因为在该 MIC 判断界值下,所检测药敏结果敏感性和特异性与 Bactec MGIT960 结果高度一致,证明微孔板变色硅胶显色法性能可靠;通过 ROC 曲线分析,提示 95% 以上的特异度,说明利用该产品测得 MIC 值可以有效地判断出 MTB 对 RIF 敏感株和耐药株,能获得较为详细的菌株耐药数据。

因为利用 MTB 临床分离菌株进行检测,必然需要先将临床标本适当处理后进行培养,再将培养到的较纯化的优势菌进行下一步检测,这就需要耗费较长时间,难以满足临床需要。本实验组利用变色硅胶微孔板对涂阳痰标本直接进行 RIF 药敏检测,结果发现:(1)MIC 判断界值仍然为 1.00 μg/mL,因为在该 MIC 判断界值下,所检测药敏结果敏感性和特异性与 Bactec MGIT960 结果高度一致,均达到 95.0% 左右,能满足对临床痰标本直接检测实验要求。(2)最佳接种标本为近 1 个月未接受抗结核治疗且分级计数 3<sup>+</sup>、4<sup>+</sup> 痰标本,经过换算 4<sup>+</sup> 痰标本经过适当处理检测终浓度可达到或接近 10.00<sup>-3</sup> mg/mL,即达到最佳检测菌量<sup>[19]</sup>。而分级计数 1<sup>+</sup> 或已经过半月以上抗结核治疗涂阳痰标本,MTB 活力较弱或较少,观察时间会明显延长,对此类标本最好采用集菌方法。(3)痰标本中存在 MTB 异质性耐药时,在最佳报告时间和硅胶颜色改变存在一定差异,肉眼判断困难,使用微孔板检测仪更能提高分辨率。通过对比结果如果提示 MTB 异质性耐药,可考虑通过检测结核 RNA、DNA 联合结核培养等进一步明确诊断<sup>[20-21]</sup>。直接检测涂阳痰标本 RIF 药物敏感性进行了有益尝试,进一步缩短了报告时间,提高了检出效率,但尚需要大样本测试才能确定相关检测标准。本课题组为测试 MTB 药物敏感性专门研发的这一产品,综合考虑了硅胶负载技术、硅胶孔径分布对 CO<sub>2</sub> 吸附性能、酸碱指示剂负

载量及变色灵敏度、MTB 在对数繁殖时产生 CO<sub>2</sub> 的能力等量效关系,并对疏水性能、温度、酸碱度、惰性、CO<sub>2</sub> 吸附性能进行了测试,达到直接检测痰标本中 MTB 的药敏要求,较其他的 MTB 表型药敏检测系统具有明显的性价比优势,能克服常用 MTB 分子药敏技术的一些不确定性弱点。

微孔板变色硅胶显色板这一新型 MTB 药敏诊断产品目前还在多家协作单位不断测试并进一步完善产品过程中,但该产品技术原理明确、具有成本低、准确、快速、操作简单等优点,具有良好的推广应用前景,向基层结核病防治机构推广使用的前景值得期待。

## 参考文献

- [1] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组,全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报[J]. 中国防痨杂志, 2012,34(8):485-508.
- [2] HERVE C, BERGOT E, VEZIRIS N, et al. Tuberculosis in 2015: From diagnosis to the detection of multidrug-resistant cases[J]. *Rev Mal Respir*, 2015, 32(8): 784-790.
- [3] 高丽,肖和平,胡忠义,等. 耐多药结核分枝杆菌对利福布汀和利福平的交叉耐药性分析[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2012,35(5):333-335.
- [4] 张会芬,苏俊华,李晓非,等. MGIT960 960 仪的临床应用评价[J]. 国际检验医学杂志, 2013,34(18):2453-2454.
- [5] CRESWELL J, CODLIN A J, ANDRE E, et al. Results from early programmatic implementation of Xpert MTB/RIF testing in nine countries[J]. *BMC Infect Dis*, 2014, 14(1):2-6.
- [6] 中国疾病预防控制中心. 痰涂片镜检标准化操作及质量保证手册[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2009: 16-18.
- [7] SANDERS C A, NIEDA R R, DESMOND E P. Validation of the use of Middlebrook 7H10 agar, BACTEC MGIT 960, and BACTEC 460 12B media for testing the susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to levofloxacin[J]. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(11):5225-5228.
- [8] 李桂莲,张敬蕊,赵秀芹,等. 微孔板 Alamar Blue 显色法检测结核分枝杆菌临床分离株利福平和异烟肼耐药性研

究[J]. 中国人兽共患病学报, 2012,28(4):319-322.

- [9] 黄自坤,熊国亮,李俊明,等. 显微镜观察药物敏感度检测技术在结核病区诊断中应用[J]. 中华医院感染学杂志, 2012,22(14):3193-3196.
- [10] 田艳生,李红光,崔幸琨,等. 硝酸盐还原试验直接检测痰标本中结核分枝杆菌耐药性[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(7):653-655.
- [11] 徐礼锋,余旭良,张锋等. 液体 MGIT 培养联合 Xpert MTB/RIF 快速检测结核分枝杆菌及其耐药性的研究[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4):272-276.
- [12] HU P L, BAI L Q, LIU F G, et al. Evaluation of the Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of tuberculosis and rifampin resistance in county-level laboratories in Hunan province, China[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2014, 127(21): 3744-3750.
- [13] 王峰,桂静,赵广录,等. 基因芯片检测结核分枝杆菌利福平异烟肼耐药性的应用评价[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(12):1125-1129.
- [14] 王敏,付光宇,罗江卫. 刃天青显色法检测结核分枝杆菌的耐药性[J]. 检验医学与临床, 2012,9(13):1587-1590.
- [15] 张虎,朱佳媚,何凯歌,等. 硅胶固载咪唑离子液体的制备及二氧化碳吸附性能[J]. 现代化工, 2011, 31(11):45-48.
- [16] 赵希鹏. 硅胶的制备及应用现状[J]. 广州化工, 2011, 39(24):24-26.
- [17] 赵雁林,王黎霞,成诗明. 结核分枝杆菌药物敏感性试验标准化操作程序及质量保证手册[M]. 北京:人民卫生出版社, 2013.
- [18] 景玲杰,韩敏,乐军,等. 应用 BACTEC MGIT960 分析临床结核菌株耐药性[J]. 临床肺科杂志, 2012, 17(5):835-836.
- [19] 张小翠,艾金. 萋尼氏法痰涂片检查结核菌阳性判断标准讨论[J]. 中国医学创新, 2011, 8(33):150-151.
- [20] ZHAO P, FANG F, YU Q, et al. Evaluation of BACTEC MGIT 960 system for testing susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* to first-line drugs in China[J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e99659.
- [21] 倪丽丽,罗柳林,景玲杰,等. 恒温扩增实时荧光检测技术在肺结核诊断中的临床价值[J]. 中华检验医学杂志, 2012,35(8):702-705.

(收稿日期:2017-12-03 修回日期:2018-02-04)

(上接第 1911 页)

- [20] 吕志强,李兴华,王爱国. 桥接组合式内固定与金属锁定接骨板钉系统修复股骨干骨折的生物力学比较[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(17):24515-24521.
- [21] YUAN G X, SHEN Y H, CHEN B, et al. Biomechanical comparison of internal fixations in osteoporotic intertrochanteric fracture. A finite element analysis[J]. *Saudi*

*Med J*, 2012, 33(7):732-739.

- [22] KARAKASLI A, ACAR N, KARAARSLAN A, et al. A novel adjustable dynamic plate for treatment of long bone fractures: An in vitro biomechanical study[J]. *J Clin Orthop Trauma*, 2016, 7 Suppl 2:177-183.

(收稿日期:2017-10-16 修回日期:2018-02-24)